

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 42 44 082 A 1

51 Int. Cl.⁵:
B 01 D 57/02
C 07 K 3/14
G 01 N 27/447

21 Aktenzeichen: P 42 44 082.3
22 Anmeldetag: 24. 12. 92
43 Offenlegungstag: 30. 6. 94

DE 42 44 082 A 1

71 Anmelder:

ETC Elektrophorese-Technik Westermeier &
Schickel GmbH, 71229 Leonberg, DE

74 Vertreter:

Otte, P., Dipl.-Ing., Pat.-Anw., 71229 Leonberg

72 Erfinder:

Schickel, Hanspeter, Dr., 7400 Tübingen, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren zur hochauflösenden Zweidimensional-Elektrophorese und Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens

57 Zur hochauflösenden Zweidimensional-Elektrophorese, bei der auf einer Gelunterlage zunächst in einer ersten Richtung eine erste Trennung und anschließend eine zweite Trennung senkrecht zur ersten Richtung durch eine von der ersten Trennung unterschiedliche, z. B. eine molekulare Siebung erfolgt, wird vorgeschlagen, ein aus einem Stück bestehendes, sich in beide Dimensionen erstreckendes trockenes Gel zugrunde zu legen und zur Durchführung der Trennung der ersten Dimension lokal selektiv streifenförmig zu hydratisieren, wobei der restliche Gelbereich seine Trockengelekonfiguration beibehält, anschließend wird die Trennung in der ersten Dimension im selektiv hydratisierten Bereich durchgeführt und anschließend wird die restliche Elektrophoresefläche des Gels hydratisiert zur Durchführung der zweiten Trennung.

DE 42 44 082 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen
BUNDESDRUCKEREI 05. 94 408 026/232

12/36

Stand der Technik

Die Erfindung betrifft ein Verfahren nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1 bzw. eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens nach dem Oberbegriff des Unteranspruchs 9.

Die Kombination zweier verschiedener Elektrophorese-Methoden ist in vielfacher Form bekannt und dient beispielsweise dazu, aus komplexen Proteingemischen einen Teil der Fraktionen mit einer ersten Elektrophorese abzutrennen und anschließend mit einer zweiten nach anderen Parametern trennenden Methode weiter zu separieren, so daß beispielsweise für eine gegebene Problemstellung irrelevante Proteine die eigentlich angestrebte Trennung nicht beeinflussen oder um bei komplexen Proteingemischen dieses möglichst in sämtliche Einzelproteine zu fraktionieren, um ein Gesamtbild der Proteinzusammensetzung zu erhalten und einzelne Proteine auffinden zu können.

Einen zusammenfassenden Überblick über hochauflösende 2D-Elektrophoreseverfahren auf der Basis eines Polyacrylamid-Gels gibt der Aufsatz von Michael J. Dunn und Arthur H. Burghes "Review" in der Zeitschrift *Electrophoresis* 1983, 4, 97—116, an, so daß sich ausführliche Erläuterungen zu diesem Verfahren erübrigen unter Hinweis auf diese Veröffentlichung und auf einige weitere Veröffentlichungen entsprechend DE-OS 21 07 092; DE-OS 20 13 840; DE-PS 32 32 685 bzw. die zusammenfassende Darstellung auf Seite 31 in dem Buch "Elektrophorese-Praktikum" von Dr. Rainer Westermeier, VCH Verlagsgesellschaft mbH 6940 Weinheim. Auf dieses Buch wird auch verwiesen zum allgemeinen Verständnis elektrophoretischer Trennvorgänge, der für diese benötigten Instrumente, Chemikalien und Gele.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß zur Durchführung einer zweidimensionalen Elektrophorese die auch heute noch gebräuchlichsten Methoden darin bestehen, daß man für die isoelektrische Fokussierung (Auftrennung nach Ladung) der ersten Dimension ein mit Bezug auf das der zweiten Dimension zugrunde liegende Gel unterschiedliches, möglichst großporiges Gel verwendet, um Siebwirkungen von Anfang an zu vermeiden. Um zu einer gewünschten hohen Reproduzierbarkeit der Meßwerte zu gelangen, sollten sich beim Gelgießen ergebende Unterschiede möglichst vermeiden werden, so daß bevorzugt Fertiggele eingesetzt werden, was allerdings zu einem weiteren Problem führt wegen der Notwendigkeit, sogenannte chaotropische Mittel (Harnstoff) in der Gelmatrix zur Vermeidung von Aggregaten zwischen Proteinen und Komplexbildungen einzusetzen, aber Harnstoff in Lösung chemisch instabil bei der Lagerung solcher Fertiggele ist.

In diesem Zusammenhang ist es auch bekannt, vertikale Rundgele, Flachgelstreifen, Rundgele mit Nylonfaden (Millipore) oder foliengestützte Streifen für die Auftrennung der Ersten Dimension einzusetzen.

Anschließend muß der Übertrag von der ersten auf die zweite Dimension vorgenommen werden, wozu sich am ehesten noch IEF-Spaghetti oder IEF-Streifen auf Trägerfilmen eignen, die auf vertikale oder horizontale SDS-Gele aufgelegt werden, mit den Notwendigkeiten einer reproduzierbaren Umäquilibriumierung im SDS-Puffer, der reproduzierbaren Übertragung und dem guten Kontakt von der ersten auf die zweite Dimension und

der selbstverständlichen Kontrolle, ob alle Proteine aus der ersten Dimension herausgewandert sind.

Dabei wird bei der zweiten Dimension, also der Auftrennung nach Molekulargewicht (SDS-Elektrophorese) üblicherweise ein engporiges Gel mit hoher Siebwirkung und hohem pH-Wert eingesetzt, wobei Fertiggele wegen des hohen pH-Werts wiederum nur eine begrenzte Lagerstabilität aufweisen. Arbeitet man in diesem Zusammenhang mit einem diskontinuierlichen Puffersystem zur Erzielung guter Trennleistungen, dann ist bekannt, daß bei Fertiggele die Puffer während der Lagerung ineinander diffundieren würden.

In Verbindung mit dem sich bei einer zweidimensionalen Elektrophorese ergebenden Problemen sei schließlich noch auf zwei kürzliche Veröffentlichungen verwiesen, nämlich das US-Patent 4 874 490 (Hochstrasser) sowie das japanische Patent JP 58105053 A2 (Hitachi).

Hochstrasser benutzt zur zweidimensionalen Elektrophorese auf einem gemeinsamen Träger, beispielsweise einer Glasplatte aufgebraute zwei verschiedene Gele, und zwar ein Streifengel für die erste Dimension und ein Flachgel (slab gel), die durch einen isolierenden Bereich getrennt sind. Die beiden Gele sind fertig aufbereitet, sind also Feuchtgele, wobei das Streifengel jedenfalls chaotropische Mittel enthält und das Slabgel zur Durchführung der SDS-Elektrophorese geeignet ist (SDS = Sodiumdodecylsulfate entsprechend Natriumdodecylsulfat).

Für die Trennung der zweiten Dimension wird der isolierende Bereich entfernt und so zwischen den beiden Gelen die erforderliche elektrische Kontaktverbindung hergestellt. Es können sich daher hier die gleichen Probleme wie weiter vorn schon geschildert ergeben, nämlich die Instabilität des chaotropischen Mittel enthaltenden Fertiggele und insbesondere die Notwendigkeit des Eindringens der Proteine in das Flachgel über den früheren isolierenden Bereich. Insofern unterscheidet sich Hochstrasser auch nur gering von den bisher bekannten, auch körperlich getrennten Fertiggele zur Zweidimensional-Elektrophorese, mit dem lediglichen Unterschied, daß die erste Dimension in der geometrischen Nähe der zweiten Dimension realisiert wird.

Im Gegensatz dazu wird in dem erwähnten japanischen Patent JP 58105053 A2 zu einem eher komplizierten und zeitraubenden Verfahren gegriffen zur Durchführung einer zweidimensionalen Trennung, indem ein Porengradienten-Gel zugrunde gelegt wird unter Verzicht auf die übliche SDS-Trennung in der zweiten Dimension.

Die durch ihre Monomerkonzentration definierte Polyacrylamid-Matrix verändert sich daher in ihrer Konzentration von beispielsweise 4% auf 20 oder 25%, wobei in der niedrigsten Konzentration, die als besonders großporig angesehen werden kann, die Trennung in der ersten Dimension in der üblichen Weise durch isoelektrische Fokussierung erfolgt und anschließend durch den sich ändernden Porengradientenverlauf des Gels nach Molekülgröße, nicht nach Molekulargewicht getrennt wird. Eine weitere Schwierigkeit bei diesem zweidimensionalen Trennverfahren kann darin bestehen, daß in das gesamte Gel zur Bildung des erforderlichen pH-Gradienten Trägerampholyte, nämlich sogenannte amphotere Puffersubstanzen eingebracht sein müssen, die jeweils unterschiedliche isoelektrische Punkte haben.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine hochauflösende Zweidimensional-Elektrophorese zu schaf-

fen, die innerhalb eines einzigen Gels durchgeführt wird und sie besonders einfach und kostengünstig realisieren läßt.

Vorteile der Erfindung

Die Erfindung löst diese Aufgabe mit den Merkmalen des Anspruchs 1 bzw. des Unteranspruchs 8 und hat gegenüber den bekannten Verfahren den Vorteil, daß sowohl die isoelektrische Fokussierung der ersten Dimension als auch die SDS-Auftrennung nach Molekulargewichten unter Zugrundelegung eines echten einheitlichen gemeinsamen Gels (Single-Gel 2D-Elektrophorese) durchgeführt wird, wobei von einem Trockengel ausgegangen wird, wodurch zunächst sämtliche Probleme der üblichen feuchten Fertiggele vermieden werden, nämlich geringe Lagerfähigkeit, chemische Instabilität, mechanische Instabilität der Matrix, andererseits aber auch — zur Erzielung einer hinreichend hohen Reproduzierbarkeit — sonstige Variationen beim Gergießen, also der Polymerisation vor Ort, vermieden sind. Dennoch gelingt es, die Trennung in den beiden Dimensionen unter Zugrundelegung von völlig voneinander unabhängigen Parametern durchzuführen.

Tatsächlich gelingt es der vorliegenden Erfindung, einen langgehegten, jedoch bisher nicht realisierbaren Wunschtraum realisieren zu können, nämlich unter Zugrundelegung eines einzigen Gels die Probe aufzugeben, in der Richtung der ersten Trennung ablaufen zu lassen, anschließend in einfacher Weise umzupuffern und die Trennung der zweiten Dimension durchzuführen.

Dabei erfolgt auch bei vor liegender Erfindung die Trennung in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung und in der zweiten Dimension die Siebung nach Molekulargewicht mit SDS.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß es beim Übertrag der ersten auf die zweite Dimension nicht notwendig ist, Gelstreifen oder Gelspaghetti zu transportieren; auch ist keine physikalische Veränderung der einen zugrunde gelegten Gelmatrix notwendig.

Daher ist es auch möglich, auch, bei nur einfacher vorhandener Ausrüstung, beispielsweise also in Drittweltländern oder bei weniger aufwendigen labortechnischen Gegebenheiten einwandfreie, hochreproduzierbare und hochgenaue zweidimensionale elektrophoretische Trennungen durchzuführen, wobei es durch die Erfindung gelingt, eine Reihe von sonst erforderlichen Manipulationen bei der zweidimensionalen Trennung, sowie weitere Fehler und Variationsmöglichkeiten auszuschalten.

Da die Erfindung ein einheitliches Gel zur Verfügung stellt, das als Trockengel erst zum Zeitpunkt der Verwendung hydratisiert und mit den entsprechenden Chemikalien benetzt bzw. getränkt wird, können beide Dimensionen, also sowohl die isoelektrische Fokussierung als auch die anschließende SDS-Elektrophorese in dem gleichen Gel durchgeführt werden, so daß keine Gelmanipulationen, kein Übertrag von einem Gel auf das andere, mit den hierdurch möglichen Fehlerquellen und Verwechslungen erforderlich sind. Desgleichen ist auch kein Gergießen, kein Puffer-Anrühren erforderlich. Da die Gele vor dem Trocknen gewaschen werden, enthalten diese Trockengele keine giftigen Substanzen mehr. Aufgrund des Umstandes, daß kein Gel-Übertrag zwischen der 1. und 2. Dimension mehr nötig ist, ergibt sich:

- eine einfache Handhabung;
- eine hohe Reproduzierbarkeit;
- die Möglichkeit, große Proteinmengen aufzutrennen bei
- hoher Auflösung, wobei
- diese Arbeiten aufgrund der drastischen Vereinfachung sozusagen "nebenher" gemacht werden können.

Da zur Auswertung der Ergebnisse die erste Dimension immer mitgefärbt wird, ist

- immer eine Kontrolle des Übergangs von der ersten zur zweiten Dimension möglich.

Schließlich gelingt es aufgrund der durch die Erfindung ermöglichten verbesserten Äquilibrierung:

- auch kritische Proteine zu SDS-Micellen umzuwandeln, wobei
- die erste Dimension auch nativ gefahren werden kann.

Durch die in den Unteransprüchen aufgeführten Maßnahmen sind vorteilhafte Weiterbildungen und Verbesserungen der Erfindung möglich. Besonders vorteilhaft ist die Möglichkeit, pro Gel gleichzeitig zwei 2D-Trennungen durchzuführen, wobei

- beide Proben unter identischen Bedingungen laufen.

Eine weitere Ausgestaltung der Erfindung besteht schließlich darin, bei der ursprünglichen Herstellung des Gels ab Fabrik im Streifenbereich der ersten Dimension eine großporige Gelmatrix zugrunde zu legen und das restliche Flächengel, das sich ohne Übergang anschließt, als feinporigeres Polyacrylamid-Gel auszuliegen im Sinne eines Molekularsiebes für die Auftrennung in der zweiten Richtung nach dem Molekulargewicht.

Eine weitere, besondere vorteilhafte Ausgestaltung und Anwendung der Zweidimensional-Elektrophorese ist eine zonen-elektrophoretische Trennung oder isoelektrische Fokussierung in der ersten Dimension und eine Immun- oder Affinitäts-elektrophoretische in der zweiten Dimension. Hierzu läßt man die fraktionierten Proteine aus dem Gel der ersten Dimension elektrophoretisch in eine Gelschicht einwandern, welche z. B. monovalente oder polyvalente Antikörper (meist Immunglobuline) oder z. B. Lectine (diese reagieren hochspezifisch auf bestimmte Zuckerreste in Glykoproteinen) enthalten. Diese reaktiven Additiva binden spezifisch und quantitativ bestimmte Proteine und bilden damit Riesenmoleküle, welche im Gel nicht mehr weiter wandern und danach auf einfache Weise detektiert werden können. Diese Methode ist vor allem in der klinischen Routine viel verbreitet, da sie hochspezifisch und quantifizierbar ist.

Zeichnung

Ausführungsbeispiele der Erfindung sind in der Zeichnung dargestellt und werden in der nachfolgenden Beschreibung näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 schematisiert perspektivisch die Herstellung eines IEF-Plateaus im gemeinsamen, zugrunde liegenden Ausgangstrockengel mittels Aufpipettieren des IEF-Gemisches und

Fig. 2 das beidseitige Strecken eines streifenförmigen Vlieses als Trägermittel für das IEF-Gemisch;

Fig. 3 zeigt die Anordnung der Elektroden für die isoelektrische Fokussierung (erste Dimension), wobei zwei 2D-Elektrophoresen gleichzeitig durchgeführt werden können;

Fig. 4 zeigt die Vorbereitungen und die Ausgangsposition des gemeinsamen Gels für die Durchführung der SDS-Elektrophorese der fokussierten Proteine, während

Fig. 5 zum besseren Verständnis einmal die Trennung in der ersten Dimension: IEF und daneben die Trennung in der zweiten Dimension zeigt, wobei die fokussierten Proteine dann in Querrichtung zur ersten Trennungsrichtung über die Sammelgelfläche wandern;

Fig. 6 zeigt schließlich das gemeinsame 2D-Gel bei zwei gleichzeitig durchgeführten 2D-Elektrophoresen mit darunter perspektivisch dargestellter Äquilibrierkammer für das Quellen und Umäquilibrieren des 2D-Gels zur Vorbereitung der zweiten Trennung; schließlich zeigen als weiteres Anwendungsbeispiel die

Fig. 7, 8 und 9 den Einsatz der erfindungsgemäßen 2D-Elektrophorese zur Durchführung einer Immun- oder Affinitäts-elektrophoretischen Trennung.

Beschreibung der Ausführungsbeispiele

Der Grundgedanke vorliegender Erfindung besteht darin, ausgehend von einem einheitlichen, insofern ein einziges Molekül darstellenden Sammeltröckengel dieses zunächst streifenförmig, also in der ersten Dimension lokalisiert selektiv zu hydratisieren, vorzugsweise das erforderliche IEF-Gemisch bei diesem Verarbeitungsschritt gleich mit aufzubringen, die Trennung in der ersten Dimension durchzuführen und anschließend das 2D-Gel, dessen Trenngelbereich noch immer trocken ist und von der selektiven Hydratisierung des ersten Dimensionsstreifens vollständig unberührt geblieben ist, ebenfalls zu quellen, die IEF umzuäquilibrieren und anschließend die SDS-Elektrophorese durchzuführen.

Ausgegangen wird von einer dünnen bzw. ultradünnen Gelmatrix in einem horizontalen System zur zweidimensionalen elektrophoretischen Auftrennung, wobei die Gelmatrix auf einer dünnen Trägerfolie angeordnet ist und entsprechend einem ersten Ausführungsbeispiel eine einheitliche Polymerisationsstruktur aufweisen kann und beispielsweise wie üblich aus Polyacrylamid oder Agarose bestehen kann.

Die Erfindung beruht dabei auf der Erkenntnis, daß die Hydratisierung nur eines Teilbereichs des die Ausgangsbasis bildenden Tröckengels absolut lokalisiert bleibt auf den Bereich, der mit der Hydratisierung bzw. IEF-Gemisch-Flüssigkeit in Kontakt gekommen ist, was sich in der Weise äußert, daß nach Beendigung der selektiven Hydratisierung eine deutliche Plateaubildung im Streifenbereich der ersten Dimension erkennbar ist. D.h. daß dieser streifenförmige Gelbereich des Tröckengels insgesamt das zugeführte Flüssigkeitsgemisch vollständig aufnimmt und auch lokalisiert für sich behält, wobei keine Abgabe an benachbarte Bereiche innerhalb hier sinnvollerweise zugrunde liegender Zeiträume, beispielsweise zwischen 4 und 5 Stunden, erfolgt.

Demnach wird zur Herstellung eines solchen IEF-Plateaus streifenförmig auf die Tröckengelschicht 10 der Fig. 1 im Randbereich wie dargestellt ein streifenförmiges Vlies 11 oder ein sonstiger, gut benetzbarer Materialstreifen aufgelegt.

Im allgemeinen kann dabei so vorgegangen werden,

daß die mit einem Vlies selektiv abgedeckte Tröckengelschicht (mit nach unten gerichteter Trägerfolie aus geeignetem Material) blasenfrei in eine geringe Menge reines Wasser enthaltende Wanne eingelegt wird, um so einen guten Halt für nachfolgende Aktionen zu erzielen und ein Austrocknen während der Quellzeit zu verhindern. Anschließend wird auf das Vlies eine vorgegebene Menge (beispielsweise 2 ml eines IEF-Gemisches) mit einer Pipette 12 aufgebracht und soweit möglich gleichmäßig auf dem Vlies 11 verteilt.

Nach einiger Zeit kommt es dann noch zu einer Längung des Vlieses 11, so daß es dann sinnvoll ist, das Vlies an beiden Endseiten mit Pinzetten festzuhalten und leicht zu strecken, wie in Fig. 2 gezeigt, um so Falten zu beseitigen.

Anschließend läßt man das solchermaßen lokal hydratisierte Tröckengel für eine vorgegebene Zeit abgedeckt stehen, beispielsweise 40 min bei nativem IEF-Gemisch und 60 min bei 8 mol/L Harnstoff-Mix.

Nach Ablauf der vorgegebenen Zeitdauer wird das Vlies mit einer Pinzette abgezogen, woraufhin man feststellen kann, daß das durch das Vlies bedeckte und auf diese Weise realisierte IEF-Plateau einwandfrei angequollen ist.

Der weitere Verlauf ist dann so, wie in Fig. 3 dargestellt; da zwei 2D-Elektrophoresen gleichzeitig durchgeführt werden, sind bei gemeinsamer Mittelkathode 13 an beiden Endbereichen Anoden 14a, 14b vorgesehen, die mit den entsprechenden Elektrodenhaltern elektrisch verbunden sind. Hierauf braucht nicht weiter eingegangen zu werden, wobei jedoch vor Auflegen des 2D-Gels auf eine Kühlplatte Wasser an der Folienseite unterseits dadurch entfernt wird, daß man diese über ein Filterpapier zieht.

Anschließend läßt man in üblicher Weise die Trennung in der ersten Dimension ablaufen, wobei entsprechende Phasen (Probeneintritt, Hauptfokussierung 1 und Hauptfokussierung 2) mit jeweils unterschiedlichen elektrischen Daten und Zeitdauern durchgeführt werden.

Nach Beendigung der IEF-Trennung erfolgt Quellen und Umäquilibrieren des Sammelgels (2D-Gels), wobei im einzelnen so vorgegangen wird, daß in eine geeignete Schale eine vorgegebene Menge Gelpuffer eingefüllt und das 2D-Gel mit der Beschichtung nach unten blasenfrei auf den Rost der Schale aufgelegt und für eine vorgegebene Zeitdauer im kalten Gelpuffer gerührt wird, und zwar beispielsweise 10 min lang bei nativem IEF-Gemisch der ersten Dimension bzw. 13 min lang bei 8 Mol/L Harnstoff.

Anschließend wird das 2D-Gel aus der Schale entnommen und vertikal in eine Äquilibrierkammer gestellt zur Durchführung einer selektiven Äquilibrierung in einem heißen Sammelgel-Äquilibrierer, wie dies in Fig. 6 bei 15 gezeigt ist, wo eine sogenannte Verteq-Äquilibrierkammer dargestellt ist. Diese selektive Äquilibrierung dient der Aufbereitung der fokussierten Proteine, wobei das 2D-Gel 10 mit dem IEF-Plateau 16 in das heiße Verteq-Bad gelangt.

Anschließend kann sich noch einmal ein Aufenthalt des 2D-Gels im kalten gerührten Gelpuffer anschließen.

Nach dem Quellen und Umäquilibrieren des 2D-Gels erfolgt dann die SDS-Elektrophorese in der zweiten Dimension; das Gel wird dem Rührer oder dem Verteq-Bad entnommen, die Elektroden werden angebracht, und die SDS-Elektrophorese läuft ab.

Im einzelnen wird so vorgegangen, daß nach Entnahme des 2D-Gels dieses mit der Folienseite nach unten

auf ein Filterpapier gelegt und die Folienseite vom SDS-Puffer befreit wird, indem man das Gel über das Papier zieht.

Anschließend kann auch die Oberfläche des Gels mittels eines Elektrophoresepapiers getrocknet werden, woraufhin das 2D-Gel mit der Folie nach unten auf eine Kühlplatte gelegt wird, so wie dies in Fig. 4 im einzelnen gezeigt ist.

Es werden beidseitig Elektrodenkartons in Form kathodischer bzw. anodischer Pufferstreifen 17 und 18 auf die Geloberfläche randseitig aufgelegt; die Elektroden, die Bestandteil einer Abdeckglasplatte 19 sind, werden mit den kathodischen und anodischen Pufferstreifen in Verbindung gebracht und am jeweiligen Stromversorger die entsprechenden Werte eingestellt, um die SDS-Elektrophorese ablaufen zu lassen.

Da die beiden Trennungen bevorzugt nach dem Grundprinzip der isoelektrischen Fokussierung (erste Trennung) bzw. der SDS-Elektrophorese (zweite Trennung) ablaufen und diese beiden Trennverfahren der ersten und zweiten Dimension für sich gesehen dem Fachmann bekannt sind, ist es auch nicht erforderlich, auf weitere Detailgesichtspunkte bzw. entsprechend erforderliche Ingredienzen und Chemikalien genauer einzugehen, wobei allerdings eine vorteilhafte Ausgestaltung darin bestehen kann, daß ein diskontinuierliches Polyacrylamid-Gel zugrunde gelegt wird, das also im Streifenbereich der ersten Dimensions-Trennung großporiger ist als in der Elektrophorese-Fläche, was bei der Herstellung des Gels problemlos berücksichtigt werden kann. Nach entsprechender Trocknung ergibt sich dann das stabile Ausgangstrockengel vorliegender Erfindung von beliebiger Haltbarkeit, wobei dann an Ort und Stelle zunächst für die isoelektrische Fokussierung selektiv ein Teilbereich des Sammelgels rehydratisiert wird und erst anschließend während der nachfolgenden SDS-Äquilibrierung der fokussierten Proteine der Rest des Trockengels mit SDS-Puffer ebenfalls rehydratisiert wird.

Die Zweidimensional-Elektrophorese ermöglicht ferner eine zonen-elektrophoretische Trennung oder isoelektrische Fokussierung in der ersten Dimension und eine Immun- oder Affinitäts-elektrophoretische in der zweiten Dimension. Hierzu läßt man die fraktionierten Proteine aus dem Gel der ersten Dimension elektrophoretisch in eine Gelschicht einwandern, welche z. B. monovalente oder polyvalente Antikörper (meist Immunglobuline) oder z. B. Lectine (diese reagieren hochspezifisch auf bestimmte Zuckerreste in Glykoproteinen) enthalten (siehe Fig. 7 bis 9). Diese reaktiven Additiva binden spezifisch und quantitativ bestimmte Proteine und bilden damit Riesenmoleküle, welche im Gel nicht mehr weiter wandern und danach auf einfache Weise detektiert werden können. Diese Methode ist vor allem in der klinischen Routine viel verbreitet, da sie hochspezifisch und quantifizierbar ist.

Hierzu wird für die zweite Dimension durch ein weiteres Vlies 11' geeigneter Größe auch noch ein selektiver Teil der Fläche der zweiten Dimension mit einer Lösung aus z. B. Antikörpern oder z. B. Lectinen rehydratisiert. Weil man in vielen Fällen bereits die Position der gesuchten Proteine in der ersten Dimension kennt, braucht man nur eine relativ kleine Fläche mit den teuren Additiva zu quellen und spart dadurch erheblich an Kosten (Antikörper und Lectine sind sehr teuer). Anschließend wird das gesamte Gel mit dem entsprechenden Puffer rehydratisiert, dabei werden gleichzeitig die Proteine umgepuffert. Dann wird die Elektrophorese in

der zweiten Dimension durchgeführt.

Die hierdurch erzielten Vorteile dieser Modifikation sind die gleichen wie weiter vorn beschrieben; hinzu kommt eine weiter selektive Rehydratisierung.

Abschließend wird darauf hingewiesen, daß die Ansprüche und insbesondere der Hauptanspruch Formulierungsversuche der Erfindung ohne umfassende Kenntnis des Stands der Technik und daher ohne einschränkende Präjudiz sind. Daher bleibt es vorbehalten, alle in der Beschreibung, den Ansprüchen und der Zeichnung dargestellten Merkmale sowohl einzeln für sich als auch in beliebiger Kombination miteinander als erfindungswesentlich anzusehen und in den Ansprüchen niederzulegen sowie den Hauptanspruch in seinem Merkmalsgehalt zu reduzieren.

Patentansprüche

1. Verfahren zur hochauflösenden Zweidimensional-Elektrophorese, wobei auf einer Gelunterlage zunächst in einer ersten Richtung durch isoelektrische Fokussierung oder eine andere elektrophoretische Trenntechnik eine erste Trennung und anschließend eine zweite Trennung senkrecht zur ersten Richtung durch eine von der ersten Trennung unterschiedliche, z. B. eine molekulare Siebung erfolgt, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein aus einem Stück bestehendes, sich in beide Dimensionen erstreckendes trockenes Gel zugrunde gelegt und zur Durchführung der isoelektrischen Trennung der ersten Dimension lokal selektiv streifenförmig hydratisiert wird, wobei der restliche Gelbereich seine Trockengelkonfiguration beibehält, anschließend wird die Trennung in der ersten Dimension im selektiv hydratisierten Bereich durchgeführt, woraufhin die restliche Elektrophoresefläche des Gels (Slab-Gel) hydratisiert wird zur Durchführung der zweiten Trennung.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Trockengel auf einer Trägerfolie ab Werk frei von chaotropischen Substanzen bzw. SDS-Puffern oder anderen Additiven hergestellt wird und für den späteren Gebrauch rehydratisiert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur selektiven Hydratisierung für die IEF-Trennung oder eine andere elektrophoretische Trennung der ersten Dimension auf einem Randbereich des Trockengels ein gut benetzbarer Materialstreifen (Vliesstreifen) aufgelegt und auf diesen das IEF-Gemisch oder eines anderen Elektrophoresepuffers aufgebracht (aufpipettiert) wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—3, dadurch gekennzeichnet, daß nach vorgegebener Einwirkungszeit des IEF-Gemisches oder eines anderen Elektrophoresepuffers über das Zwischenmaterial vom Trockengel im IEF-Bereich lokalisiert ein Plateau durch Gelquellung gebildet ist, woraufhin durch Verbinden mit entsprechenden Elektroden die isoelektrische Fokussierung oder eine andere elektrophoretische Trennung der ersten Dimension durchgeführt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—4, dadurch gekennzeichnet, daß unter Zugrundelegung des durch die selektive Hydratisierung gebildeten IEF- oder Elektrophorese-Plateaus gleichzeitig zwei 2D-Elektrophoresen durchgeführt werden, indem zu beiden Seiten des Plateaus zu untersuchen-

Fig.1

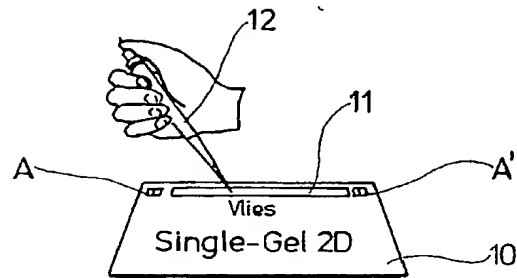


Fig.2

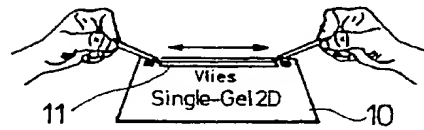


Fig.3

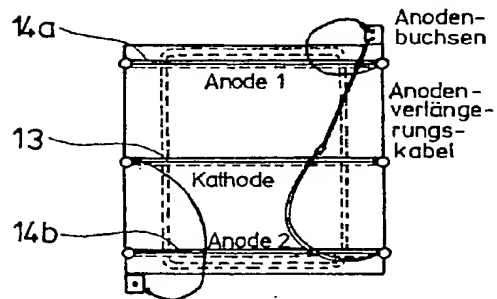


Fig.4

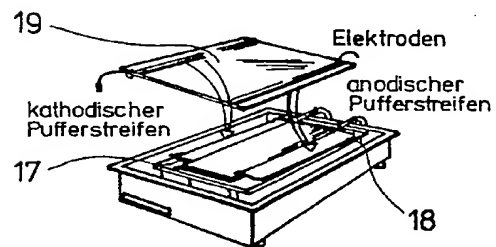


Fig.5

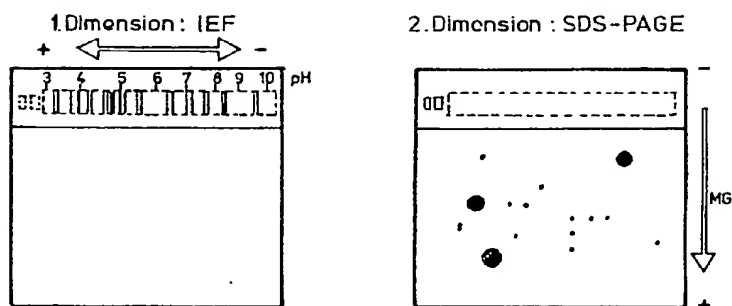


Fig.6

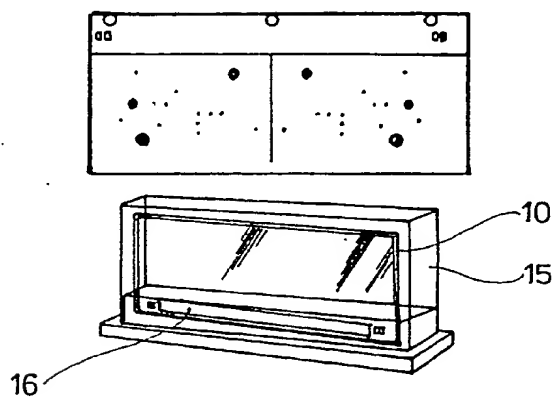


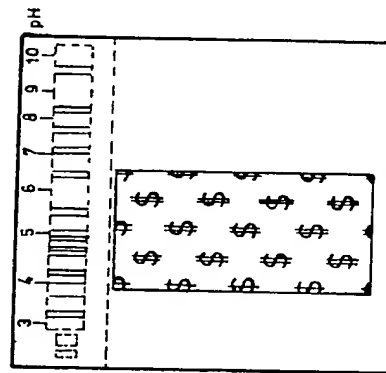
Fig.7

1. Dimension: IEF



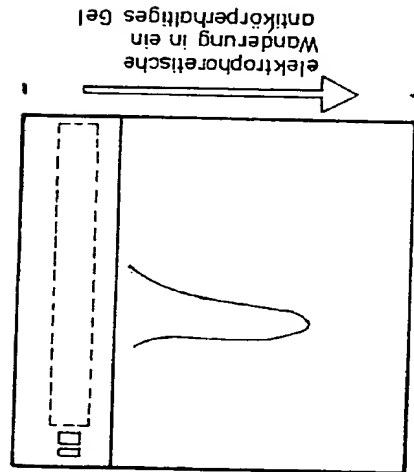
Fig.8

2. Dimension: Immunelektrophorese



selektives
Rehydrieren
mit Antikörpern

Fig.9



elektrophoretische
Wanderung in ein
antikörperhaltiges Gel